



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 44 26 315 C 1

⑤① Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**A 61 F 2/10**  
A 61 F 13/02

②① Aktenzeichen: P 44 26 315.5-35  
②② Anmeldetag: 25. 7. 94  
②③ Offenlegungstag: —  
②④ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 21. 3. 96

DE 44 26 315 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:  
W. L. Gore & Associates GmbH, 85640 Putzbrunn, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Klunker und Kollegen, 80797 München

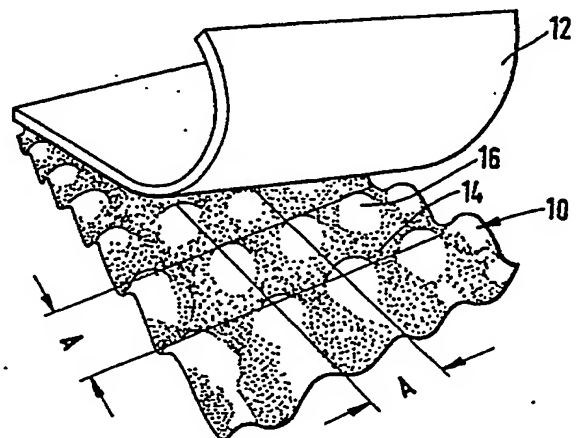
⑦② Erfinder:  
Bertholdt, Günter, 85591 Vaterstetten, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

US 49 85 036  
EP 04 62 428 A1  
WO 93 19 700 A1

⑥④ Membran zur Regeneration von Körpergeweben und Verwendung der Membran als Wundabdeckung und Hautersatz

⑥⑦ Die Erfindung betrifft eine Membran zur Regeneration von Körpergeweben aus einem resorbierbaren, biokompatiblen Material, ein Verfahren zur Herstellung dieser Membran, sowie ihre Verwendung für die in-vitro-Kultivierung von Zellkulturen, als Wundabdeckung und als Hautersatz, wobei die Membran eine Porosität besitzt, die sie für Gase und Makromoleküle durchlässig macht, für Zellen dagegen undurchlässig macht, und wobei die Membran insbesondere eine eierkartonartige Mikrostruktur in Form von Höckern und Vertiefungen besitzt, die bevorzugt fließend ineinander übergehen.



DE 44 26 315 C 1

Die Erfindung betrifft eine Membran zur Regeneration von Körpergeweben aus einem resorbierbaren, biokompatiblen Material, ein Verfahren für ihre Herstellung, ihre Verwendung für die in-vitro-Kultivierung von Zellkulturen, sowie einer Wundabdeckung und einem Hautersatz, und deren Verwendung.

Die äußere zelluläre Schicht der menschlichen Haut (Epidermis) wird durch eine Basalmembran von der darunter liegenden zellulären Schicht (Dermis) getrennt. Diese Basalmembran, die sich durch eine besondere, gewellte Struktur (Rete-Leisten) auszeichnet, besteht aus sogenannten ECM-Proteinen (Extra-Cellular-Matrix), die teils von Epidermis-Zellen (Keratinocyten), teils von Dermis-Zellen (Fibroblasten) synthetisiert werden. Die Basalmembran stellt einerseits eine zelluläre Barriere dar, erlaubt aber andererseits Gas- und Stoffaustausch zwischen den beiden Zellschichten.

Die Basalzellen erzeugen durch Zellteilung die Zellen der darüber liegenden Schichten, man nimmt an, daß mit der Struktur der Rete-Leisten auch die Struktur der Hautoberfläche determiniert wird.

Bei großflächigen Verletzungen der Haut, bei der neben der Epidermis auch die Basalmembran zerstört wird, kann diese Struktur nicht mehr ohne weiteres nachgebildet werden. Zwar können Keratinocyten ausgehend von den Wundrändern und den sogenannten Hautanhangsgebilden (z. B. Haare, Schweißdrüsen) die Hautoberfläche neu besiedeln. Jedoch werden insbesondere die Rete-Leisten meist nicht mehr oder nur ungenügend ausgebildet. Das neugebildete Gewebe ist morphologisch und funktionell deutlich von der normalen Haut verschieden und wird als Narbengewebe bezeichnet.

Werden, wie z. B. bei drittgradigen Brandwunden, auch tiefere Hautschichten verletzt und mit ihnen die Keratinocyten der Hautanhangsgebilde zerstört, ist auch eine geordnete Narbenbildung nicht mehr möglich. Dies bedeutet, daß eine Wundheilung erschwert und meist mit Deformationen, wie einseitig gerichteten Kontraktionen, und Wucherungen verbunden sind.

Die bisherigen Behandlungsverfahren haben im wesentlichen das Ziel durch mechanische und/oder chemische (z. B. Salben, Gele) Abdeckung die Wunde vor Infektionen und weiteren Verletzungen zu schützen und gegebenenfalls ein günstiges Klima für die Wundheilung zu schaffen. Über die besten Bedingungen für die Wundheilung gibt es unterschiedliche Auffassungen, wobei z. B. eine Schule die trockene, eine andere Schule die feuchte Wundheilung favorisiert. Beiden gemeinsam ist die Absicht, die natürliche Wundheilung möglichst ungestört ablaufen zu lassen.

Zur Behandlung von tiefen, großflächigen Wunden bringt derzeit die Transplantation körpereigener Haut die besten Ergebnisse. Dazu wird die Haut zur Oberflächenvergrößerung durch ein besonderes Verfahren mit Hilfe einer Vielzahl kleiner Schnitte in eine netzartige Konfiguration ("mesh graft") gebracht.

In besonders schweren Fällen, wenn, wie z. B. bei bestimmten Verbrennungen, 80 bis 90% der Körperoberfläche geschädigt sind, ist für eine autologe (körpereigene) Transplantation nicht genügend ungeschädigtes Gewebe vorhanden. In diesen Fällen gelingt es, basierend auf den bahnbrechenden Arbeiten von Green und Rheinwald (Cell, 6, 331-334, 1975), aus einer Biopsie gewonnene Keratinocyten in vitro in einer Zellkultur zu vermehren, in Form von dünnen Zellschichten (sheets)

zu züchten und schließlich auf den Patienten zu transplantieren.

Zur Verbesserung der mechanischen Stabilität und der Handhabbarkeit der Zellschichten (sheets) wurden diese auf schwammartigen Matrices angesiedelt. Die Matrices bestehen in der Regel aus Kollagen und/oder Hyaluronsäure oder Polylactid und/oder Polyglycolid. Auch resorbierbare und nicht resorbierbare Netze sowie Filze aus Polylactid und/oder Polyglycolid wurden verwendet. Obwohl diese schwammartigen Matrices gegenüber einfachen Sheets den Vorteil höherer mechanischen Stabilität haben, ist der höhere Gehalt an Fremdmaterial, sowie auch der erhöhte Zeitbedarf, der für die Besiedlung mit Zellen benötigt wird, nachteilig.

Aus der WO 93/19700 ist ein Implantationssystem bekannt, das als wesentlichen Bestandteil eine PTFE Membran mit bestimmten Porendurchmesser und Dicke besitzt in dem Zellen angesiedelt werden, die in der Lage sind, gewisse biologische Produkte zu bilden. Das System dient nicht der Regeneration der Haut.

Aus der EP 0 462 426 ist bereits eine Membran bekannt, die als Hautersatz verwendet werden kann. Die Membran besteht aus einem biokompatiblen Material und ist perforiert. Die Löcher sind regelmäßig angeordnet und haben einen Durchmesser zwischen 10 und 1000 Mikron. Die Lechperforierung soll das Einwachsen der Membran und die Hautregeneration unterstützen. In den Lochbereichen bilden sich Mikrokolonien von eingesäten autologen oder heterologen Keratinocyten. Die Membran befindet sich noch in der klinischen Erprobung.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde eine Membran zu schaffen, die die Rekonstruktion von lebendem biologischen Gewebe unterstützt und insbesondere die Regeneration von Körpergeweben und der menschlichen Haut.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch eine Membran gelöst, welche die Merkmale des Kennzeichens des Anspruchs 1 aufweist.

Die Erfindung basiert ganz wesentlich auf der Erkenntnis, daß die Basalmembran mit gut ausgebildeten Rete-Leisten von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität der Haut ist. Sie geht weiter davon aus, daß normale Zell- und ECM-Strukturen entstehen, wenn dafür geeignete Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Zu diesen Bedingungen gehört nicht nur, daß epidermale Zellschichten mit dermalen in Kontakt kommen, sondern daß zusätzlich eine bestimmte dreidimensionale Struktur vorhanden sein muß, welche Bereiche mit unterschiedlichen Bedingungen, z. B. in der Versorgung mit Sauerstoff oder der lokalen Konzentration bestimmter Signalmoleküle erzeugt. Erst durch diese Bedingungen wird eine Kaskade von Ereignissen ausgelöst, die zu einer vollständigen Geweberegeneration führt.

Die erfindungsgemäße Membran stellt in Form und Funktion ein resorbierbares Äquivalent der Basalmembran der menschlichen Haut dar, die solange als "Platzhalter" dient, bis die Zellen entsprechende eigene funktionelle Strukturen aufgebaut haben.

Der besondere Vorteil der Erfindung ist es, daß mit einem minimalen Anteil an Fremdmaterial und Zeit in einer Zellkultur oder im Körper die entscheidenden Anfangsbedingungen für die natürliche Regeneration eines komplexen Gewebes geschaffen werden können.

Die Membran erlaubt eine strukturierte Anheftung von Makromolekülen, die die Haftung bzw. die Nicht-Anheftung bestimmter Zelltypen fördern oder sonstige

Zellreaktionen auslösen. Es ist auch möglich, durch Zell-sortierung bestimmte Zellen zu isolieren und diese gezielt in einem bestimmten Verhältnis in den Vertiefungen der Membran zu verteilen. Da die Basalmembran in vielen anderen Körpergeweben vorkommt, eignet sich die erfindungsgemäße Membran auch zur Regeneration dieser Gewebe.

Die Membran selbst stellt keine morphologisch genaue Nachbildung der Basalmembran der menschlichen Haut dar. Die eigenstabile Mikrostruktur zeichnet sich vielmehr durch in regelmäßigem Raster verteilte Höcker und Vertiefungen aus, die beispielsweise durch die Überlagerung zweier Sinus-Wellen beschrieben werden kann. Man könnte die Mikrostruktur der Membran im Prinzip auch mit der Form eines "Eierkartons" vergleichen, die insbesondere auch Festigkeit gegen Scherkräfte besitzt. Die Übergänge zwischen Höckern und Vertiefungen sind bevorzugt weich und fließend, ohne Kanten ausgebildet.

Die gewellte Oberflächenstruktur erlaubt es, Membranen so aufeinander zu stapeln, daß Hohlräume entstehen, die einerseits bei Kontakt mit Flüssigkeiten diese durch die Kapillarwirkung aufsaugen, und in denen andererseits Zellen wachsen können, ohne mechanisch geschädigt zu werden. Solche Anordnungen haben sich im Zusammenhang mit Wundpflastern bewährt.

Die Membran hat eine Dicke von 2 bis 20 Mikron, vorzugsweise etwa 5 Mikron. Ganz allgemein gilt, daß abhängig vom Material die Membran so dünn als möglich ausgebildet sein soll, wobei sie jedoch noch handhabbar bleiben muß.

Die Porengröße der Membran liegt vorzugsweise unter 3 Mikron. Die Poren sollen so beschaffen sein, daß sie für Gase wie Sauerstoff und Makromoleküle durchlässig, für Zellen jedoch undurchlässig sind.

Die Größenordnung der räumlichen Mikrostruktur liegt im Bereich von 50–500 Mikron. Der Abstand der einzelnen Höcker bzw. Vertiefungen voneinander oder mit anderen Worten das Rastermaß beträgt vorzugsweise etwa 200 Mikron. In der gleichen Größenordnung liegt die Höhe bzw. Tiefe der Höcker und Vertiefungen.

Das Material, aus dem die Membran besteht ist vorzugsweise ein Material, das von lebenden Zellen abgebaut werden kann und dessen Abbauprodukte keine negative Auswirkung auf den Regenerationsprozeß der Haut haben. Bevorzugt werden Polyglycolid, Polylactid, Copolymere dieser Stoffe oder ihre Derivative, Polydioxanone, Polyphosphazene, Polysulfone und Polyurethane. Auch Polyhydroxybuttersäure, mit Netzmittel vernetztes Kollagen oder Hyaluronsäure sind geeignet. Weitere Beispiele für geeignete Materialien sind in der EP 0 462 426 genannt, auf deren Offenbarung ausdrücklich Bezug genommen wird. Das Material muß jedenfalls solange stabil sein, bis ausreichend körpereigene Strukturen aufgebaut sind, d. h. vorzugsweise etwa 5 bis 10 Tage.

Die Herstellung der eigenstabilen Mikrostruktur erfolgt mittels herkömmlicher Verfahren. Bevorzugt wird ein Prägeverfahren. Die Mikroporosität kann ebenfalls durch bekannte Verfahren erzeugt werden. Auch kann ein filzartiges oder faserig extrudiertes Material als Ausgangsmaterial für die Membran eingesetzt werden. Die mechanischen und chemischen Eigenschaften der Membran lassen sich durch Auswahl geeigneter Monomere genau einstellen.

Nachfolgend soll die Erfindung anhand der beigefügten Zeichnung erläutert werden. Darin zeigen:

Fig. 1 eine perspektivische Ansicht der Membran mit

der Mikrostruktur und einer halb aufgeklappten äußeren Membran;

Fig. 2 einen schematischen Querschnitt durch ein Wundpflaster;

Fig. 3 eine schematische Darstellung gestapelter Membrane getrennt durch ein Gitternetz.

Für die Wundabdeckung großer drittgradiger Brandwunden wird die erfindungsgemäße Membran mit der Mikrostruktur (Bezugsziffer 10 in Fig. 1) direkt auf die Wunde gelegt. Keratinozyten werden aus einer Biopsie vom Patienten isoliert und 2–3 Wochen in einer Zellkultur vermehrt. Diese Keratinozyten werden in Suspension gebracht und mit Fibrinkleber auf der Membran mit Mikrostruktur fixiert. Darüber wird eine äußere, von der erfindungsgemäßen Membran verschiedene Membran (Bezugsziffer 12 in Fig. 1) gelegt. Die Keratinozyten sammeln sich in den Vertiefungen 14 und bilden dort eine "kritische" Masse für optimale Wachstumsbedingungen. Da bei Verwendung von Suspensionen eine festigkeitssteigernde Differenzierung der Zellen nicht abgewartet werden muß, wie es etwa bei der Produktion von Sheets der Fall wäre, kann der Patient nach wesentlich kürzerer Wartezeit versorgt werden. Durch die Ansammlung der Keratinozyten in den Vertiefungen könnte diese besonders schonend verteilt werden. Diese Art der Auftragung ist einer dünnen, gleichmäßigen Auftragung vorzuziehen.

Die äußere Membran 12 besteht z. B. aus Polyurethan, mikroporösem Polyethylen oder PTFE. Sie ist durchlässig für Gase und Wasserdampf, aber undurchlässig für Flüssigkeiten und Keime.

Fig. 2 zeigt ein erfindungsgemäßes Wundpflaster, bestehend aus einer äußeren Membran 12 und einem Stapel aus resorbierbaren Membranen 10 mit Mikrostruktur, die durch resorbierbare Netze 18 voneinander getrennt werden. Das Netz verhindert, daß die Membranen zu dicht aufeinander liegen (Fig. 3). Maximales Hohlraumvolumen ergibt sich, wenn die Höcker 16 einer oberen Membran 10 über den Vertiefungen 14 einer unteren Membran 10 liegen. Das Netz kann dazu dienen, die Membranen an den Stellen 20 miteinander zu verkleben, z. B. durch kurzzeitiges thermisches Erweichen des Netzmaterials. Das Netz kann gegebenenfalls entfallen. Die resorbierbaren Membrane sind perforiert, um Blut und Sekret durchtreten zu lassen. Die äußere Membran (12) kann randseitig über die innere Membran hinausragen und in diesem Bereich mit Klebstoff versehen sein, um eine Fixierung des Wundpflasters auf der Haut zu ermöglichen.

Die übereinander gestapelten Membranen formen ein Kissen, in das Blut und Sekrete durch Kapillarkräfte eindringen können. Die Blutgerinnung erfolgt auf diesen Membranen. Die Keratinozyten wandern entlang der von Fibrin besetzten Höckern in das Pflaster ein und haften sich bevorzugt dort an. Die Wundheilung erfolgt im wesentlichen ohne Narbenbildung. Beim Abziehen des Pflasters nach eingetretener Heilung bzw. zum Wechseln verbleiben wundnahe Membranschichten auf der Wunde, deren Oberfläche sie schützen und deren neugebildete Strukturen erhalten bleiben. Auch die Schmerzrezeptoren bleiben bedeckt, so daß das Ablösen des Wundpflasters bei besonders schmerzempfindlichen Patienten ohne Probleme erfolgen kann.

Schließlich kann die Membran auch zur Kokultivierung von unterschiedlich differenzierten Zellen zur Regeneration von Geweben verwendet werden. Diese können z. B. zur Transplantation, zur Untersuchung von Gewebefunktionen, zur Synthese hochwirksamer Ma-

kromoleküle oder als biologischer Sensor verwendet werden. Man spannt die Membran in einen Rahmen und beaufschlagt beide Seiten des Rahmens nacheinander mit einer Zellsuspension zweier unterschiedlicher Zellarten. Nach Sedimentation und Fixierung der einen Zellart wird der Rahmen gewendet und das gleiche Verfahren mit einer Suspension der anderen Zellart wiederholt.

#### Patentansprüche

1. Membran zur Regeneration von Körpergeweben aus einem resorbierbaren, biokompatiblen Material, **gekennzeichnet durch** die Kombination der folgenden Merkmale
  - einer Porösität mit Poren, die für Gase und Makromoleküle durchlässig, für Zellen dagegen undurchlässig sind,
  - einer Mikrostruktur in Form von Höckern (16) und Vertiefungen (14).
2. Membran nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine gleichförmige Dicke aufweist.
3. Membran nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Höcker (16) und Vertiefungen (14) regelmäßig in Rasterform angeordnet sind.
4. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Höcker (16) und Vertiefungen (14) alle gleich ausgebildet sind und sich in ihrer Größe entsprechen.
5. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrostruktur eigenstabil ist.
6. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Höcker (16) und Vertiefungen (14) der Mikrostruktur unmittelbar aneinandergrenzen bzw. ineinander übergehen.
7. Membran nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Übergänge zwischen den Höckern und Vertiefungen weich und fließend, ohne Kanten sind.
8. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Mikrostrukturen von Ober- und Unterseite der Membran entsprechen.
9. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Dicke der Membran zwischen 2 und 20 Mikron liegt.
10. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Dicke der Membran vorzugsweise etwa 5 Mikron beträgt.
11. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Porengröße unter 3 Mikron beträgt.
12. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Abstand (A) von Höcker (16) zu Höcker (16) und von Vertiefung (14) zu Vertiefung (14) 50 bis 500 Mikron, vorzugsweise etwa 200 Mikron beträgt.
13. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Höcker und Vertiefungen eine Höhe bzw. Tiefe von etwa 200 Mikron aufweisen.
14. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Material für die Membran aus natürlichen ECM-Molekülen oder synthetischen Molekülen besteht.
15. Membran nach Anspruch 14, dadurch gekenn-

zeichnet, daß das Material für die Membran aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Polylactid, Polyglycolid, Kopolymeren dieser Stoffe oder ihren Derivaten, Polydioxaneon, Polyphosphazen, Polysulfon, Polyurethan, Polyhydroxybuttersäure, Hyaluronsäure oder mit Netzmittel vernetztem Kollagen besteht.

16. Verwendung der Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur In-Vitro-Kultivierung von Zellen.

17. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß an beiden Seiten der Membran in-vitro-kultivierte und sedimentierte Zellen fixiert sind.

18. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß körpereigene Keratinozyten auf der Membran fixiert sind.

19. Verwendung der Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15, 17 oder 18 als künstliche Haut.

20. Verwendung der Membran nach Anspruch 18 zur Abdeckung drittgradiger Brandwunden.

21. Verwendung der Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15 in einem Wundpflaster, bestehend aus wenigstens einer Membran (10) und einer äußeren Membran (12), die gasdurchlässig, keimdicht und flüssigkeitsdicht ist.

22. Verwendung der Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15 in einem Wundpflaster gemäß Anspruch 21, gekennzeichnet durch einen Stapel von Membranen (10), die gegebenenfalls durch Netze (18) aus resorbierbarem Material voneinander getrennt bleiben.

23. Verwendung der Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15 in einem Wundpflaster gemäß einem der Ansprüche 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranen (10) perforiert sind, um Blut und Sekret durchtreten zu lassen.

24. Verwendung der Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15 in einem Wundpflaster gemäß einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die äußere Membran (12) randseitig über die innere Membran (10) hinausragt und in diesem Bereich mit Klebstoff (20) beschichtet ist.

25. Verfahren zur Herstellung einer Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrostruktur geprägt wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

FIG. 1

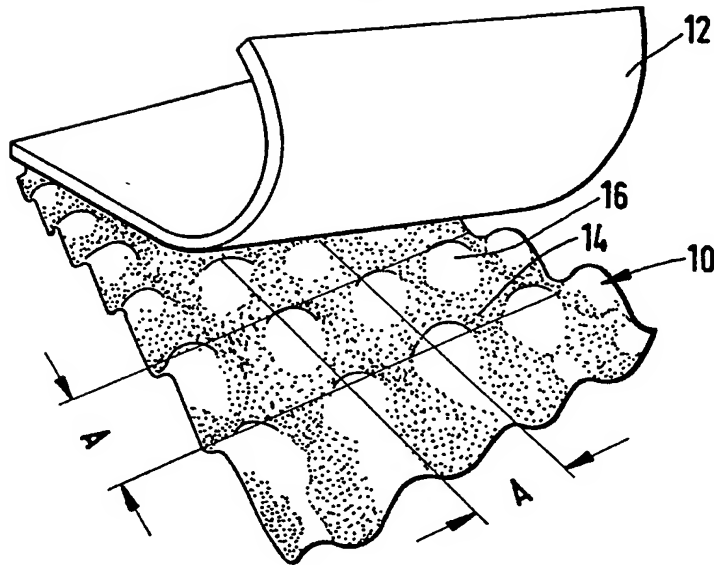


FIG. 2

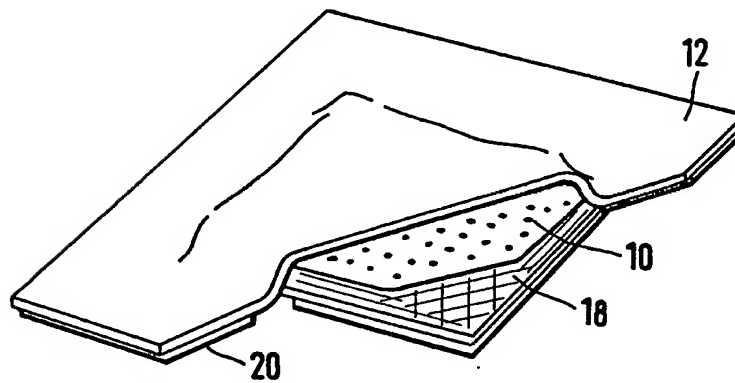


FIG. 3

